





© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Syarat mutu	2
5 Pengambilan contoh	2
6 Cara Uji.....	3
7 Syarat lulus uji	3
8 Higiene.....	3
9 Pengemasan.....	3
10 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji kakao bubuk	4
Bibliografi.....	29
Tabel 1 - Syarat mutu kakao bubuk.....	2
Tabel A.1 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran (0,1 g/ml; 0,01 g/ml dan 0,001 g/ml) contoh	19
Tabel A.2 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella</i>	26
Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella</i>	26

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Kakao bubuk* merupakan revisi dari SNI 01-3747-1995, *Kakao bubuk*.

Tujuan penyusunan standar ini adalah:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan produk pangan yang jujur dan bertanggung jawab ;;
- Diversifikasi produk/pengembangan produk ;
- Mendukung perkembangan industri kakao;

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang – undang RI No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan
2. Undang – undang RI No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
3. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan
4. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.
5. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 - 04 Makanan dan minuman. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 22 Januari 2007 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Juni 2009 sampai dengan tanggal 22 Agustus 2009 dengan hasil RASNI.

Kakao bubuk

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji kakao bubuk.

2 Acuan normatif

SNI 19-0428-1998, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

kakao bubuk

produk yang diperoleh dari bungkil kakao yang diubah bentuknya menjadi bubuk

3.2

bungkil kakao (*cocoa press cake*)

produk yang diperoleh dari kakao bubuk setelah dihilangkan sebagian lemaknya dengan atau tanpa perlakuan alkalisasi

3.3

kakao bubuk

produk berupa pasta yang diperoleh dari kakao nib (keping biji kakao) melalui penggilingan tanpa menghilangkan kandungan lemaknya

3.4

kakao nib (keping biji kakao)

biji kakao yang telah dihilangkan kulitnya

3.5

biji kakao

biji tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang telah dibersihkan dan dikeringkan

3.6

alkalisasi

proses penambahan suatu bahan alkalis yang sesuai pada biji kakao atau keping biji kakao (*nibs*) atau bungkil kakao (*cocoa press cake*) dengan tujuan untuk mengatur keasaman agar mencapai tingkat yang diinginkan

4 Syarat mutu

Syarat mutu kakao bubuk sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu kakao bubuk

Parameter uji	Satuan	Syarat mutu
Keadaan:		
a. Bau	-	khas kakao, bebas dari bau asing
b. Rasa	-	khas kakao, bebas dari bau asing
c. Warna	-	coklat atau warna lain akibat alkalisasi
Kehalusan (lolos ayakan mesh 200) (b/b)	%	min. 99,5
Kulit (<i>shell</i>) dihitung dari alkali free nib (b/b)	%	maks. 1,75
Kadar air (b/b)	%	maks. 5,0
Kadar lemak (b/b)	%	min. 10,0
Cemaran logam:		
a. Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 2,0
b. Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 1,0
c. Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40
Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 1,0
Cemaran mikroba:		
a. Angka Lempeng Total	koloni/g	maks. 5×10^3
b. Bakteri bentuk coli	APM/g	< 3
c. <i>Escherichia coli</i>	per g	negatif
d. Salmonella	per 25 g	negatif
d. Kapang	koloni/g	maks. 50
e. Khamir	koloni/g	maks. 50

5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai SNI 19-0428-1998.

6 Cara Uji

Cara uji untuk kakao bubuk seperti di bawah ini.

- a) Persiapan contoh uji sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
- c) Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji kehalusan sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji kulit (shell) sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7
 - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.7.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
- h) Cara uji cemaran arsen sesuai Lampiran A.8
- i) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.9.1
 - Cara uji bakteri bentuk coli dan *E.coli* sesuai Lampiran A.9.2
 - Cara uji Salmonella sesuai Lampiran A.9.3
 - Cara uji Kapang/ Khamir sesuai Lampiran A.9.4

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 3.

8 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman cara produksi pangan olahan yang baik.

9 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan peraturan yang berlaku tentang label dan iklan pangan

Lampiran A (normatif)

Cara uji kakao bubuk

A.1 Persiapan contoh uji kimia

A.1.1 Cara kerja

- Aduk contoh sampai merata, kemudian buat menjadi bentuk persegi panjang dan bagi secara diagonal menjadi empat bagian;
- Ambil dua bagian yang saling berhadapan, aduk sampai rata, kemudian lakukan kembali seperti pengerjaan di atas sehingga diperoleh jumlah yang cukup untuk dianalisis;
- Masukkan contoh ke dalam botol dan tutup rapat.

A.2 Keadaan

Cara uji keadaan dilakukan secara sensorik terhadap bau, rasa, dan warna.

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan hidung sebagai indera penciuman.

A.2.1.2 Cara kerja

- ambil contoh uji yang sudah dilelehkan dalam beaker glass sebanyak 30 ml;
- cium contoh uji untuk mengetahui baunya;
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 panelis terlatih atau lebih.

A.2.2 Rasa

A.2.2.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan lidah sebagai indera perasa.

A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji yang sudah dilelehkan dalam beaker glass sebanyak 50 ml;
- rasakan contoh uji dengan lidah untuk mengetahui rasanya;
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 panelis atau 1 panelis terlatih.

A.2.3 Warna

A.2.3.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan mata sebagai indera penglihat.

A.2.3.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji yang sudah dilelehkan dalam beaker glass sebanyak 50 ml, tuangkan ke dalam wadah berwarna putih;
- amati warna contoh uji;
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 panelis atau 1 panelis terlatih.

A.3 Kadar lemak**A.3.1 Prinsip**

Ekstrak minyak bebas dari contoh kakao massa dengan menggunakan pelarut organik non polar yang sebelumnya dilakukan hidrolisis.

A.3.2 Peralatan

- neraca analitis ketelitian 0,0001 g;
- labu didih dasar rata kapasitas 250 ml;
- oven (pengering listrik);
- penangas listrik;
- alat ekstraksi soxhlet lengkap;
- timbangan ekstraksi atau selongsong kertas saring ukuran 33 mm x 80 mm;
- gelas piala 300 ml – 500 ml;
- kaca arloji;
- kertas saring bebas lemak;
- desikator.

A.3.3 Pereaksi

- asam klorida (HCl) 8 M;
- petroleum ether, titik didih 30 °C – 60 °C;
- larutan perak AgNO_3 0,1 N.

A.3.4 Cara kerja**A.3.4.1 Hidrolisis**

- timbang 4 g sampai dengan 5 g contoh dengan ketelitian ke dalam gelas piala;
- tambahkan perlahan 45 ml air suling mendidih sambil diaduk hingga homogen;
- tambahkan 55 ml HCl 8M (2 bagian HCl ditambah 1 bagian air) dan beberapa butir batu didih;
- tutup gelas piala tersebut dengan kaca arloji lalu didihkan perlahan-lahan selama 15 menit;
- cuci dengan 100 ml air suling dan masukkan air pembilas tersebut ke dalam gelas piala;
- saring endapan melalui kertas saring yang bebas lemak;
- bilas gelas piala 3 kali dengan air suling, lakukan pencucian hingga bebas khlor yang dapat ditentukan dengan menambahkan 1 tetes sampai dengan 3 tetes AgNO_3 terhadap filtrat, jika tidak terdapat endapan putih (AgCl) maka telah bebas khlor;
- pindahkan kertas saring serta isinya ke dalam timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring yang bebas lemak dan keringkan selama 6 jam sampai dengan 18 jam pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C.

A.3.4.2 Ekstraksi Lemak

- keringkan selama 1 (satu) jam labu didih yang berisi beberapa butir batu didih pada suhu 100 °C. Dinginkan dan timbang lalu; sambungkan dengan alat ekstraksi *soxhlet*
- kemudian tempatkan timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring ke dalam *soxhlet*, kemudian tuangkan pelarut petroleum ether sampai kurang dari 2/3 kapasitas labu didih. Kemudian ekstrak selama 4 jam lalu uapkan pelarut dengan alat penguapan atau dapat dihilangkan dengan cara memanaskan labu di atas penangas air.
- Kemudian keringkan labu didih beserta lemak di dalam oven pada suhu 100 °C selama 1,5 jam sampai dengan 2 jam, dinginkan dalam desikator dan timbang;
- ulangi pengeringan sampai perbedaan penimbangan berat lemak yang dilakukan berturut-turut kurang dari 0,05 %.

A.3.5 Perhitungan

Kadar lemak dinyatakan dalam persentase bobot per bobot dan dihitung dalam bobot kering dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{(m_1 - m_2)}{m_0} \times 100 \%$$

keterangan:

m_1 adalah bobot labu + lemak setelah pengeringan, (g)
 m_2 adalah bobot labu kosong, (g)
 m_0 adalah bobot contoh, (g)

A.4 Kadar Air

A.4.1 Prinsip

Bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu 100 °C. Bobot hilang atau kadar air dihitung secara gravimetri.

A.4.2 Peralatan

- eksikator;
- oven;
- neraca analitik
- cawan nikel, platina atau aluminium bertutup.

A.4.3 Cara kerja

- masukkan dengan seksama 2 g contoh ke dalam cawan bertutup yang sudah diketahui bobot tetapnya, tutup dan timbang;
- keringkan cawan yang berisi contoh dalam oven pada suhu $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$ dalam kondisi tutup dibuka hingga bobotnya konstan;
- tutup cawan pada saat masih dalam oven dan pindahkan ke dalam desikator, dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit kemudian timbang;
- hitung kadar air dalam contoh.

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{(m_1 - m_2)}{m_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

m_0 adalah bobot contoh, (g);

m_1 adalah bobot contoh sebelum dikeringkan, (g);

m_2 adalah bobot contoh setelah dikeringkan, (g).

A.5 Kehalusan

A.5.1 Prinsip

Pengukuran derajat kehalusan dari contoh menggunakan ayakan mesh 200.

A.5.2 Peralatan

- a) gelas piala;
- b) batang pengaduk;
- c) ayakan (mesh 200);
- d) Erlenmeyer sedot;
- e) Kertas saring Whatman 41;
- f) neraca analitik;
- g) oven 103-105 °C;
- h) Botol pencuci;

A.5.3 Pereaksi

- a) Aceton p.a
- b) Detergen (konsentrat-surface active agent)

A.5.4 Cara kerja

- a) timbang kira-kira 10 g contoh ke dalam gelas piala. Tambahkan 1 g detergen dan 20 ml air suling panas dan aduk dengan batang pengadukl secara hati-hati sampai tidak terdapat gumpalan lagi, kemudian, tambahkan 280 ml air suling panas (75 ± 5) °C dan aduk dengan kuat selama 2 menit dengan menggunakan pengaduk mekanik.
- b) tuangkan suspensi ke dalam ayakan (mesh 200) goyangkan. Bilasi gelas piala dan penyaring dengan 1,5 L air suling panas (75 ± 5) °C. Apabila suspensi sulit lolos, tepuk penyaring secara perlahan-lahan sampai tidak ada lagi partikel yang lolos.
- c) Bilas saringan dan residu dengan 15 ml sampai 25 ml aceton untuk menghilangkan residu air dan lemak.
- d) pindahkan saringan ke dalam kaca arloji dan keringkan selam 45 menit pada suhu 103 - 105 °C.
- e) dinginkan dalam desikator selama 45 menit
- f) timbang kertas saring, residu, dan kaca arloji.

A.5.5 Perhitungan

kadar residu (%) dari bahan kering bebas lemak = $\frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100 \%$

Kehalusan (%) = 100 % - kadar residu

Keterangan:

M₁ adalah bobot kertas saring, residu kering dan kaca arloji (g);

M₂ adalah kertas saring dan kaca arloji (g);

M₀ adalah bobot contoh, (g);

A.6 Kandungan kulit (shell) dihitung dari alkali *free nib*

A.6.1 Prinsip

Setelah didestruksi senyawa-senyawa organik dengan suatu proses yang tidak mengakibatkan hancurnya sel-sel keras, residu disuspensikan dalam gliserol.

Banyaknya kelompok sel-sel dalam suspensi dan jumlah sel dalam setiap kelompok dihitung. Kandungan kulit dihitung dengan cara penetapan empiris kurva kalibrasi yang menyatakan hubungan antara banyaknya kelompok sel keras dan ukuran rata-rata kelompok kakao bubuk dengan kandungan kulit 1 % yang diukur dalam bahan kering bebas lemak.

A.6.2 Peralatan

- Erlenmeyer 200 ml;
- Tabung sentrifusi 50 ml;
- Pemusing;
- Tabung kaca, diameter kira-kira 5 mm berujung lancip dengan diameter 1 mm panjang 150 mm;
- Kaca alas berukuran kira-kira 76 x 26 x 1,0 mm;
- "Counting grid" berukuran kira-kira 20 x 26 x 0,5 mm dengan ukuran luas 1 mm².

A.6.3 Pereaksi

Pereaksi Belluci:

Asam asetat glasial + HNO₃ pekat + H₂O = 36 + 5 + 9

A.6.4 Cara kerja

- Timbang kira-kira 0,5 g contoh bubuk kering bebas lemak (telah dikeringkan selama 1 jam pada suhu 100 °C) dan masukkan ke dalam gelas piala 150 ml. Tambahkan 20 ml pereaksi Belluci sambil diaduk secara perlahan dididihkan selama 10 menit di atas nyala kecil dengan pengadukan secara berkala lalu dinginkan.
- Timbang tabung kultur dalam gelas beaker 30 ml sebagai penyangga. Pindahkan sedikit demi sedikit residu ke dalam tabung kultur dengan sedikit bagian air, pemusing selama lebih dari 3 menit dengan kecepatan maksimum. Buang cairan supernatan, tambahkan air sampai mencapai $\frac{3}{4}$ tabung dan kocok sampai residunya terpisah.
- Buang kembali cairannya, tambahkan gliserol (3 bagian gliserol + 2 bagian air) sampai berat tabung dan penyangganya mencapai (20 ± 0,03) g melebihi berat awal. Kocok dengan kuat sampai benar-benar tercampur, segera pindahkan ke wadah gelas yang berisi batang magnet kecil. Tahan wadah gelas dan biarkan sampai gelembungnya hilang (kira-kira 5-10 menit).
- Timbang bersamaan kaca arloji berskala dan kaca penutupan. Aduk cairan dengan menggunakan pengaduk magnetik selama 1 menit pada kecepatan maksimum dimana

gelembung tidak terbentuk. Pindahkan cairan ($0,04 \pm 0,01$) g ke bagian tengah kaca obyek berskala, timbang 0,1 mg. Tempatkan penahan karet dalam tabung gelas untuk mencegah evaporasi.

- e) Tempatkan kaca objek berskala pada mikroskop dengan atau tanpa kondensor bagian atas dan dengan filter jenis pemindah cahaya serta menghamburkan cahaya.
- f) Hitung 2 slide dengan cara scan slide pada 100 x dan hitung stone cell pada ≥ 100 x. Hitung seluruh stone cell, baik yang berupa satuan maupun yang berkelompok juga semua stone cell yang belah yang mana $\geq 0,5$ cell. Jangan menghitung fragmen yang lebih kecil.

A.6.5 Perhitungan

Perhitungan *stone cell*

$$S = \frac{84C}{17200M - C}$$

Keterangan:

C adalah banyaknya stone cell pada cairan;

M adalah mg alkali free nib (= 1 000 WD/L);

W adalah gram contoh;

D adalah gram cairan yang dihitung;

L adalah dilutes test solution

A.7 Cemarkan logam

A.7.1 Penentuan kadar timbal (Pb) dan kadmium (Cd)

A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb.

A.7.1.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml sampai dengan 100 ml;
- c) penangas listrik;
- d) kertas *Whatman* No. 41;
- e) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- f) spektrofotometer Serapan Atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- g) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- h) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- i) gelas ukur kapasitas 10 ml;
- j) gelas piala 250 ml; dan
- k) penangas air.

A.7.1.3 Pereaksi

- a) Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);

- b) larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19) ;
- c) larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
- d) encerkan 7 ml HNO₃ 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan asam klorida, HCl 6N;
- f) encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- g) larutan baku 1 000 µg/ml Cd;
- h) larutkan 1,000 g Cd dengan 7 ml HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1000 µg/ml siap pakai.
- i) larutan baku 200 µg/ml Cd;
- j) pipet 10 ml larutan baku 1 000 µg/ml Cd ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/ml Cd.
- k) larutan baku 20 µg/ml Cd;
- l) pipet 10 ml larutan baku 200 µg/ml Cd ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/ml Cd.
- m) larutan baku kerja Cd;
- n) pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,5 ml, 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,8 µg/ml; 1,4 µg/ml dan 1,8 µg/ml Cd.
- o) larutan baku 1000 µg/ml Pb;
- p) larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/ml siap pakai.
- q) larutan baku 50 µg/ml Pb; dan
- r) pipet 5,0 ml larutan baku 1 000 µg/ml Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/ml.
- s) larutan baku kerja Pb;
- t) pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 1,5 µg/ml dan 2,0 µg/ml Pb.

A.7.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselin/platina/kuarsa (m);
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 450 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;

- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6N atau 5 ml HNO₃ 1N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai dengan 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring *Whatman* No.41;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi; dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, (µg/ml);

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh (g).

A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang.

A.7.2 Penetapan timah (Sn)

A.7.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO₃ dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serangan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂.

A.7.2.2 Peralatan

- a) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) erlenmeyer 250 ml;
- c) penangas listrik;
- d) kertas *Whatman* no. 41;
- e) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C
- f) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- g) pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml terkalibrasi;
- h) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1 000 ml, terkalibrasi;
- i) gelas ukur kapasitas 50 ml;
- j) gelas piala 250 ml;
- k) penangas air.

A.7.2.3 Pereaksi

- a) larutan kalium, 10 mg/ml K;

- b) larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml;
- c) asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- d) asam klorida pekat, HCl pekat;
- e) larutan baku 1000 mg/l Sn; dan
- f) larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml asam HCl pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- g) larutan baku kerja SN.
- h) pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/l Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 15 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$ dan 25 $\mu\text{g/ml}$ Sn.

A.7.2.4 Cara kerja

- a) timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) ke dalam erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml HNO_3 pekat, dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 ml sampai dengan 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai dengan 15 ml;
- f) tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 ml air suling;
- g) tambahkan 1,0 ml KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tara dengan air suling, dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi Sn ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Sn (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi Sn dari kurva kalibrasi, ($\mu\text{g/ml}$);

V adalah volume larutan akhir, (ml);

M adalah bobot contoh, (g).

A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.8 Cemaran arsen (As)

A.8.1 Prinsip

Contoh didestruksi menggunakan campuran asam sulfat dengan hidrogen peroksida. Arsen segera ditetapkan dengan penambahan larutan natrium borohidrida dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom memakai sistem hidrida pada panjang gelombang 193,7 nm.

A.8.2 Preaksi

- asam sulfat (1,84);
- hidrogen peroksida 30 %;
- larutan natrium borohidrida (NaBH_4) 5 % dalam 1 % larutan NaOH kemudian disaring menggunakan kertas saring yang berpori 0,45 μm ;
- asam klorida encer (150 ml HCl dalam 1000 ml air);
- larutan baku arsen (As^{5+}), tiap ml mengandung 100 μg As
- larutkan 0,132 g As_2O_3 kering dalam 20 ml larutan NaOH 30 %, tambahkan perlahan-lahan sambil diaduk 100 ml air suling, kemudian 10 ml H_2SO_4 pekat, encerkan dengan air suling sampai tanda batas pada labu ukur 1 000 ml (tiap ml larutan mengandung 0,1 mg As atau 100 μg As);
- larutan kalium iodida 16 %.

A.8.3 Peralatan

- spektrofotometer serapan atom lengkap dengan hidrida kit;
- neraca analitik kapasitas 200 g ketelitian 0,1 mg;
- labu ukur 10 ml, 100 ml, 1 000 ml;
- labu kjehdal 250 ml.

A.8.4 Cara kerja

- timbang dengan teliti 2 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam labu kjehdal yang berisi beberapa butir batu didih, destruksi dengan 5 ml hidrogen peroksida dan 2,5 ml asam sulfat secara hati-hati hingga diperoleh larutan yang jernih, jika belum jernih tambahkan peroksida dan panaskan kembali. Kerjakan berulang-ulang hingga larutan menjadi jernih;
- dinginkan, tambahkan 2 kali 5 ml air suling dengan pemanasan hingga terbentuk uap/asap putih, dinginkan kembali, lalu pindahkan ke dalam labu ukur 10 ml dan tepatkan sampai tanda batas;
- kerjakan blanko seperti perlakuan pada contoh;
- pipet 2,5 ml larutan contoh ke dalam tabung khusus untuk pemeriksaan arsen menggunakan spektrofotometer serapan atom dan tambahkan 10 ml HCl 15 %, 0,25 ml larutan KI 16 %, segera ukur serapannya setelah ditambahkan 2 ml NaBH_4 dengan panjang gelombang 193,7 nm. Kerjakan juga terhadap blanko.

A.8.5 Cara menyatakan hasil

$$\text{Konsentrasi Arsen (ug/g)} = \frac{A_c}{A_b} \times C \times \frac{V}{W}$$

Keterangan:

- Ac adalah serapan larutan contoh yang diperoleh;
 Ab adalah serapan larutan baku yang diperoleh;
 V adalah volume larutan contoh;
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam g;
 C adalah kadar baku yang mendekati contoh.

A.9 Cemarkan mikroba

A.9.1 Angka lempeng total

A.9.1.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *mesofil aerob* setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang cocok selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.9.1.2 Pembenihan dan Pengenceran

- buffer pepton water* (BPW);
- larutkan 25,5 g BPW dalam 1000 ml air suling, sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.
- plate count agar* (PCA);
- larutkan 22,5 g PCA dalam 1000 ml air suling, sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

A.9.1.3 Peralatan

- cawan petri gelas (15 mm x 100 mm) atau plastik (15 mm x 90 mm), disterilkan;
- pipet 1 ml; 1 ml; 5 ml dan 10 ml berskala;
- botol pengenceran gelas bersilikat yang resisten, dengan sumbat karet atau tutup uliran dari plastik;
- penangas air dengan termostat untuk mengatur suhu agar $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- lemari pengeram atau inkubator $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- autoklaf;
- alat penghitung koloni bakteri, model *dark field* atau sejenis dengan sumber cahaya dan gridplate;
- oven terkalibrasi.

A.9.1.5 Prosedur

- Persiapan contoh
- timbang 50 g contoh uji ke dalam kantong plastik yang steril, masukkan dalam 450 ml larutan pengencer (*buffer pepton water*) dengan cara aseptik sehingga diperoleh pengenceran 1:10, kemudian kocok campuran hingga homogen;
- dengan menggunakan pipet steril berbeda, buatlah pengenceran tingkat 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dari contoh yang telah dipersiapkan sesuai kebutuhan. Cara melakukan pengenceran sepuluh kali ialah dengan mencampur 10 ml dari tingkat pengenceran yang sebelumnya dengan 90 ml zat pengencer, semua tingkat pengenceran dikocok 25 kali dengan panjang busur 30 cm selama 7 detik.

- d) kocok tiap botol pengenceran untuk melarutkan bahan yang mengendap, lalu pipet 1 ml dari setiap pengenceran untuk dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang telah diberi label dan lakukan duplo;
- e) tuangkan 12 ml sampai dengan 15 ml media plate count agar suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke masing-masing cawan petri dalam waktu 15 menit sejak pengenceran pertama dibuat, untuk setiap deretan pengenceran, tuangkan pula agar dengan zat pengencer sebagai inokulum ke dalam cawan petri untuk digunakan sebagai kontrol;
- f) pembenihan dan medium agar dicampur merata dengan menggerakkan cawan petri ke belakang, ke depan dan memutar pada permukaan datar;
- g) biarkan sampai campuran dalam cawan membeku;
- h) masukkan cawan petri ke dalam lemari pengering dengan posisi terbalik pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam;
- i) hitung jumlah bakteri pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan catat hasilnya untuk tiap tingkat pengenceran.

A.9.1.6 Perhitungan

Rata-ratakan hasilnya dan laporkan sebagai jumlah total per g contoh uji. Jumlah bakteri total per g = rata-rata jumlah koloni per cawan dikalikan dengan faktor pengenceran.

Angka lempeng total = $n \times f$

Keterangan:

n adalah rata-rata jumlah koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran (koloni/ g);
f adalah faktor pengenceran.

A.9.1.6.1 Cara menghitung koloni

- a. hitung koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni dari satu pengenceran, hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.
jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni - 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per gram dengan rumus :

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

Keterangan:

N adalah jumlah bakteri per gram, (koloni/ g);
 $\sum C$ adalah jumlah semua koloni pada cawan petri yang dihitung, (koloni);
 n_1 adalah jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah cawan petri pada pengenceran kedua yang dihitung;
d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dalam perhitungan.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
232	33
244	28

$$N = \frac{(232+244+33+28)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)] \times (10^{-2})} = 24,000$$

- b) bila terdapat satu atau lebih cawan petri yang mengandung lebih atau kurang dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan gunakan rumus pada poin a);
- c) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah;
- d) jika semua cawan petri mengandung lebih dari 250 koloni untuk semua pengenceran, catat jumlah bakteri sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD);
- jika jumlah bakteri kurang dari 100 koloni per cm^2 dengan penyebaran koloni yang representatif mendekati 250, buatlah suatu taksiran jumlah koloni tersebut dan hasilnya dinyatakan sebagai jumlah perkiraan bakteri yaitu jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	jumlah perkiraan bakteri
TBUD	640	640.000 ($6,4 \times 10^6$)

- jika jumlah bakteri lebih dari 100 koloni per cm^2 maka nyatakan hasilnya sebagai $> 100 \times \text{faktor pengenceran} \times \text{area}$;

Contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2 :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah perkiraan bakteri
TBUD	7150	65	$> 6.500.000 (6,5 \times 10^6)$
TBUD	6490	59	$> 5.900.000 (5,9 \times 10^6)$

- e) bila tak terdapat koloni sama sekali pada tingkat pengenceran ini, catat dan nyatakan sebagai < 10 . Cara penulisan ini menyatakan suatu taksiran.
- f) Semua plate dengan koloni yang melebar (spreaders) dan/atau karena kesalahan pengerjaan di laboratorium (laboratory accident). Dilaporkan sebagai Spreader (SPR) atau Laboratory Accident (LA).

A.9.1.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) bila angka ketiga dari kiri adalah 5 atau lebih besar dari 5, maka angka tersebut diganti menjadi nol dan angka kedua dibulatkan ke atas,
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530, penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) bila angka ketiga adalah 4 atau kurang dari 4, maka angka ketiga diganti dengan nol dan angka kedua dipertahankan,
contohnya : 528 menjadi 520, penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5 maka dibulatkan sebagai berikut :
- bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil,
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580, penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560, penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.9.2 Penentuan bakteri *Coliform* dan *Escherichia Coli*

A.9.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Coliform* yang ditandai dengan terbentuknya gas dalam tabung Durham, setelah contoh uji diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 24 jam sampai 48 jam yang selanjutnya dirujuk kepada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.9.2.2 Pembenihan dan pengenceran

- buffer pepton water (BPW);
Larutkan 25.5 g BPW dalam 1000 ml air suling, sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.
- lauryl Sulphate Tryptose (LST) broth;
- brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %
- E.C broth;
- Levine's eosin methylene blue (L-EMB) agar;
- Plate count agar (PCA);

A.9.2.3 Peralatan

- autoklaf
- pipet 1 ml; 5 ml; 10 ml berskala;
- botol pengenceran gelas bersilikat yang resisten, dengan sumbat karet atau tutup uliran dari plastik;
- penangas air dengan termostat untuk mengatur suhu agar $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- lemari pengeram atau inkubator $35 \pm 1 ^\circ\text{C}$;
- autoklaf;
- jarum inokulasi (ose) dengan diameter kira-kira 3 mm;
- tabung reaksi dan tabung durham;
- rak untuk tabung reaksi.

A.9.2.4 Cara kerja

A.9.2.4.1 APM- *Presumptive test* untuk bakteri coliform dan E.Coli (uji dugaan)

- Lakukan persiapan contoh sesuai A.9.1.5 a), b);
- inokulasi masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran ke dalam tiga tabung yang berisi lauryl sulfate broth. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung, biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu $35 ^\circ\text{C}$.
- amati tabung-tabung setelah (24 ± 2) jam, jika ada tabung yang telah mengandung gas maka tabung tersebut dinyatakan positif;
- tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan sebagai tabung negatif, lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- catat adanya pembentukan gas setelah inkubasi (48 ± 2) jam dan nyatakan tabung tersebut 'positif';
- lakukan *confirmed test* (uji penegasan) terhadap semua tabung yang positif pada *presumptive test*;

A.9.2.4.2 APM- Confirmed test untuk bakteri coliform (uji penegasan)

- pindahkan satu mata ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- inkubasikan tabung-tabung BGLB 2 % ini selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel A.1, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- laporkan sebagai APM bakteri coliform per g

A.4.2.4.3 APM-Confirmed test untuk Escherichia coli (uji penegasan)

- pindahkan satu mata ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung EC broth yang berlainan;
- inkubasikan tabung-tabung EC tersebut selama \pm 24 jam pada $45,5 ^\circ\text{C}$, tabung yang mengandung gas dinyatakan sebagai tabung positif;
- apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) , jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan positif;

A.9.2.4.4 APM-Complete test untuk Escherichia coli (uji lengkap)

- Kocok tabung-tabung EC yang positif secara hati-hati;
- goreskan/ tanamkan pada satu cawan agar L-EMB sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm;
- inkubasikan cawan L-EMB tersebut selama $(18 - 24)$ jam pada $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna coklat/ kehijauan dengan atau tanpa kilat logam;
- dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang mencurigakan pada tabung agar miring PCA;
- inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama $(18 - 24)$ jam pada $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dan gunakan untuk test selanjutnya;
- buatlah pewarnaan g dari tiap biakan E.coli adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang diuji menggunakan reaksi-reaksi IMViC seperti di bawah ini serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST untuk menegaskan adanya produksi gas;
 - Pembentukan Indol,
Inokulasi tabung tryptone broth, inkubasi selama (24 ± 2) jam pada $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, uji adanya indol dengan menambahkan $(0,2 \text{ sampai dengan } 0,3)$ ml pereaksi Kovacs. Uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
 - Reaksi Voges Proskauer dan Methyl red
Inokulasi tabung medium MR-VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada $35 ^\circ\text{C}$, secara aseptis pindahkan 1 ml biakan ke tabung reaksi steril. Tambahkan 0,6 ml larutan 5 % alfa naftol dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin, aduk dan biarkan selama 2 jam. Uji positif jika warna eosin berubah menjadi merah muda. Tabung medium MR-VP yang semula diinkubasi selama (48 ± 2) jam pada $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, tambahkan 5 tetes indikator methyl red pada setiap tabung, biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.
 - Penggunaan sitrat
Dengan hati-hati tabung Koser's citrate medium diinokulasi, inkubasi selama 96 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, reaksi positif jika terbentuk kekeruhan.
 - Pembentukan gas dari lactose

Inokulasikan tabung LST dari setiap agar miring PCA, inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, periksa tabung-tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

- h) Klasifikasikan sebagai E.Coli apabila IMViC dengan pembentukan Indol, Methyl red, Voges Proskauer dan Citrat adalah -- (biotype 1) atau --- (biotype 2).
- Selain dengan IMViC test, bisa digunakan API20E atau automated VITEK biochemical assay untuk identifikasi E.Coli.
- i) Hitung APM E.Coli dengan menggunakan tabel APM berdasarkan jumlah tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung E.Coli.

Tabel A.1 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran (0,1 g/ml; 0,01 g/ml dan 0,001 g/ml) contoh

Tabung positif			APM/ g	Batas Toleransi		Tabung positif			APM/ g	Batas Toleransi	
0,1	0,01	0,001		Rendah	Tinggi	0,1	0,01	0,001		Rendah	Tinggi
0	0	0	< 3,0	-	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	> 1100	420	-

A.9.3 Salmonella

A.9.3.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan pada media pengkayaan dan ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif, kemudian dilakukan isolasi terhadap koloni-koloni yang diduga sebagai *Salmonella* dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidak bakteri *Salmonella*.

A.9.3.2 Pembenihan dan pereaksi

- a) Lactose broth;
- b) Nonfat dry milk (reconstituted)
- c) Tetrathionate Broth (TTB);
- d) Brain Heart Infusion (BHI) broth
- e) Brilliant Green Dye Solution 1 %
- f) Rappaport Vassiliadis (RV) medium;
- g) Bismuth sulfite agar (BSA);
- h) Hectoen Enteric (HE) Agar;
- i) Triple Sugar Iron (TSI) agar;
- j) Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar;
- k) Lysine Iron Agar (LIA);
- l) MacConkey agar;
- m) Urea broth;
- l) Lysine Decarboxylase broth (LDB)
- m) Tryptone (tryptophane) broth;
- n) trypticase soy-tryptose broth;
- o) Bromcresol purple dye solution 0,2 %;
- p) Urea broth;
- q) rapid urea broth;
- r) malonate broth;
- s) larutan potassium hydroxide 40 %;
- t) reagen kovacs;
- u) Simmons citrat agar;
- v) MR-VP broth;
- w) Phenol red lactose;
- x) Purple lactose broth;

A.9.3.4 Peralatan

- a) timbangan terkalibrasi, dengan kepekaan 0.1 mg;
- b) inkubator (35 ± 1) °C;
- c) sendok-sendok steril;
- d) cawan petri, gelas atau plastik, 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm;
- e) pipet 1 ml dan berskala 0,01 ml, 0,1 ml, dan 10 ml;
- f) jarum inokulasi dengan diameter dalam sosok kira-kira 3 mm (ose);
- g) kantong plastik 28 cm x 37 cm, steril, yang dapat ditutup/ disegel kembali.;
- h) tabung reaksi dan raknya;
- i) oven;
- j) penangas air;
- k) pengaduk gelas;
- l) botol pengencer
- m) alat ukur pH
- n) bunsen

A.9.3.5 Cara kerja

A.9.3.5.1 Persiapan contoh dan pra-pengkayaan (*pre-enrichment*)

- timbang 25 g contoh ke dalam tabung blender steril;
- tambahkan 225 ml reconstitute non fat milk steril, kocok selama 2 menit;
- pindahkan secara aseptis ke dalam botol steril 500 ml, biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup;
- tambahkan 0,45 ml 1 % larutan brilliant green dye dan kocok hingga tercampur merata;
- kendurkan tutup wadah secukupnya atau $\frac{1}{4}$ putaran;
- inkubasi pada 35°C selama (24 ± 2) jam;

A.9.3.5.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang sudah selesai diinkubasi;
- tambahkan 0.1 ml biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 ml Rappaport-Vassiliadis (RV) medium dan 1 ml ke dalam 10 ml tetrathionate (TT) broth;
- inkubasi RV pada $(42 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dan TT broth $(35 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ selama (24 ± 2) jam

A.9.3.5.3 Penanaman dan pembenihan pilihan/ selektif

- dengan menggunakan jarum ose bulat 3 mm (10ul), goreskan biakan dari media pengkayaan TT ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan disimpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- ulangi langkah di atas dari media pengkayaan RV;
- inkubasi selama (24 ± 2) jam;
- amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella*.

- Morfologi koloni *Salmonella* :

Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Tipikal koloni *Salmonella* adalah sebagai berikut:

HE : koloni berwarna biru kehijauan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin hampir semua berwarna hitam. Sebagian kecil kultur *Salmonella* membentuk koloni berwarna kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media HE dan XLD.

XLD : koloni berwarna merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin hampir semua berwarna hitam.

BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam, kadang-kadang mengkilap seperti logam. Jika masa inkubasi ditambah maka warna media di sekitar berubah dari coklat menjadi hitam (*halo effect*). Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap di sekitar media.

- Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni yang diduga pada media BSA setelah inkubasi (24 ± 2) jam, lanjutkan inkubasi selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni tersangka setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dengan menggunakan jarum ose steril, inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru lakukan inokulasi dengan jarum ose yang sama pada media LIA dengan cara menusuk agar tegak 2 kali setelah itu digoreskan pada agar miring. Karena reaksi Lysine decarboxylase sangat anaerobik

- maka LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang dipilih pada suhu (5 - 8) °C;
- f) Inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam dengan kondisi tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S berlebihan.
- TSI : kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa gas H₂S (warna kehitaman pada agar).
- LIA : kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Pada umumnya kultur *Salmonella* menghasilkan H₂S pada LIA dan beberapa kultur non *Salmonella* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA.
- g) Semua kultur yang dipertimbangkan sebagai potensial *Salmonella* dan dilakukan uji biokimia dan serologi adalah sebagai berikut :
- memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan dalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI;
 - memberikan reaksi asam pada tusukan di media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan TSI.
- Kultur yang memberikan asam pada media LIA dan asam pada goresannya dan reaksi asam pada tusukannya di TSI dapat dinyatakan bukan *Salmonella*.
- Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara pada subpasal e);
- h) Lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap :
- tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD, dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga kultur presumtif yang diinokulasikan dari RV;
 - jika tiga kultur presumtif positif TSI dari media agar yang lain, uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

A.9.3.6 Identifikasi *Salmonella*

A.9.3.6.1 Kultur campuran

- a) Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media MacConkey agar, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang di duga *Salmonella* :
- a) *MacConkey agar*.
Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan yang disebabkan oleh bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
- b) *Hektoen Enteric (HE) agar*
Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* akan membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir semua koloni terlihat berwarna hitam;
- c) *Xylose Lysine dextroxycholate (XLD) agar*
Koloni merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni berwarna hitam.
- b) Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* pada media TSI dan LIA sesuai Pasal A.9.3.5.3 e dan f.

A.9.3.6.2 Kultur murni

- a) Uji urease (konvensional)
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam Urea broth. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- b) Uji urease (cepat)
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea broth*. Inkubasikan selama 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Reaksi *Salmonella* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna);

A.9.3.6.3 Uji serologi polyvalent flagellar (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif ke dalam:
 - BHI broth, dan inkubasi selama 4 jam sampai 6 jam pada suhu 35°C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama) atau
 - Trypticase Soy Trypticase broth (TSTB) dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan formanilized physiological saline ke dalam 5 ml kultur di atas;
- b) Siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi formanilized physiological saline *Salmonella* polyvalent flagellar (H) antisera. Masukkan 0,5 ml formanilized antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48°C sampai dengan 50°C . Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.
 - Positif jika terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol.
 - Negatif jika tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.
 - Non spesifik, jika terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.9.3.6.4 Uji kultur urease negative

- a) *Lysine Decarboxylase broth (LDB)*
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan.
 - Ambil 1 ose dari agar miring TSI gores yang dicurigai *Salmonella* dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati pada interval 24 jam. *Salmonella* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % bromocresol purple dye dan amati perubahan warnanya;
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % dulcitol
 - Inokulasi media dulcitol broth dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (phenol red sebagai indikator) atau ungu (bromocresol purple sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth (TB)*
Inokulasi media tryptone broth dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur berikut :
 - *Potassium Cyanide (KCN) broth*
 - Pindahkan 1 ose biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN broth. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiisi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya

pertumbuhan (ditandai dengan kekeruhan). Pada umumnya *Salmonella* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai tidak terjadinya kekeruhan

- *Malonate broth*

- Pindahkan 1 ose dari biakan TB ke dalam media Malonate broth. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung Malonate broth yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru (uji positif), oleh karena itu gunakan Malonate broth sebagai kontrol. Pada umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada broth ini.

- Uji Indol

- Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai 0,3 ml pereaksi *Kovacs*, amati segera setelah penambahan reagen. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai reaksi positif.

- d. Kultur dinyatakan bukan *Salmonella* bila reaksi Indol positif dan Flagellar (H) negatif, atau KCN positif dan LBD negatif.

A.9.3.6.5 Uji serologi somatic (O) test

- dengan menggunakan pensil lilin (crayon), buat dua empat persegi masing-masing berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik ukuran 15 mm x 100 mm kaca objek berskala;
- emulsikan 1 loop ose bulat biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai 48 jam dengan 2 ml 0,85 % saline (dapat juga menggunakan biakan dari tryptose blood agar base tanpa darah);
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil lilin;
- tambahkan 1 tetes larutan saline pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes polyvalent somatic (o) antiserum ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan masing-masing bagian tersebut menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit;
- Goyangkan dengan hati-hati selama 1 menit dan amati menggunakan latar belakang gelap dan pencahayaan yang bagus.
- klasifikasi tes *polyvalent somatic (o)* menunjukkan hasil sebagai berikut :
 - Positif, jika terjadi penggumpalan di dalam campuran tes dan tidak ada penggumpalan, pada kontrol saline
 - Negatif, jika tidak ada penggumpalan di dalam campuran tes dan kontrol saline.
 - Non Spesifik, jika terjadi penggumpalan pada campuran tes dan kontrol saline.

A.9.3.6.6 Uji biokimia tambahan

Kultur yang memberikan reaksi yang khas sesuai Tabel A.2 dinyatakan sebagai *Salmonella*. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella*, uji biokimia tambahan untuk kultur-kultur TSI yang lain dari 25 g contoh tersebut tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi flagellar (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai Pasal A.5.6.1 dan Pasal A.5.6.2. Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.3.

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*

Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam - 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam;

- Positif, jika terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromcresol purple* sebagai indikator) pada semua media.
- Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* jika kultur memberikan reaksi lactose positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada malonate broth. Lakukan tes lanjutan pada kultur-kultur ini untuk menentukan apakah kultur-kultur tersebut *S. Arizonae*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*
Ikuti prosedur sesuai butir a), nyatakan sebagai bukan *Salmonella* pada kultur yang memberikan reaksi sucrose positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA;
- c) *Methyl Red-Voges-Proskauer (MR-VP) broth*
Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C
Lakukan uji *Voges-Proskauer (VP)* pada suhu ruang sebagai berikut :
 - Pindahkan 1 ml MR-VP broth yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP broth selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C .
 - Tambahkan 0,6 ml alpha naftol dan kocok.
 - Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4jam.
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi VP negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna dari merah muda menjadi merah pada keseluruhan medium.
 Uji *Methyl Red (MR)*
 - Tambahkan 5 tetes indikator *methyl red* ke dalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam.
 - Amati hasilnya dengan segera
 - Pada umumnya *Salmonella* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif. Jika kultur memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif, maka dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*
- d) *Simmons citrat agar*
 - Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C .
 - Positif, jika terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil sitrat positif.
 - Negatif, jika tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.9.3.6.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* kultur-kultur yang mempunyai reaksi sesuai Tabel A.2. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* kultur-kultur yang memberikan reaksi sesuai Tabel A.3. Bila tidak ada 1 kultur yang menunjukkan reaksi *Salmonella* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari Pasal A.5.6.3 terhadap kultur-kultur yang memberikan reaksi ureas negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.2 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella*

Uji atau substrat	Hasil		Reaksi spesies
	Positif	Negatif	
Glucose (TSI)	Tusukan kuning	Tusukan merah	
Lysine Decarboxylase (LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	
H ₂ S (TSI dan LIA)	hitam	Tidak hitam	
Urease	Warna ungu sampai merah	Tidak ada perubahan warna	-
Lysine Decarboxy broth	Warna ungu	Warna kuning	
Phenol Red Dulcitol broth	Warna kuning dengan/ tanpa gas	Tanpa terbentuk gas, tidak berubah warna	^b
KCN broth	pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
Malonate broth	Warna biru	Tidak berubah warna	- ^c
Indol test	Permukaan warna violet	Permukaan warna kuning	-
Polyvalent flagellar test	menggumpal	Tidak menggumpal	
Polyvalent somatic test	menggumpal	Tidak menggumpal	
Phenol red lactose broth	Warna kuning dengan/ tanpa gas	Tidak terbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
Phenol red sucrose broth	Warna kuning dengan/ tanpa gas	Tidak terbentuk gas dan tidak berubah warna	-
Voges-proskauer test	Merah muda sampai merah	Tidak berubah warna	-
Methyl red test	Merah menyebar	Kuning menyebar	
Simmons citrate	Pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V
keterangan: ^a adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari; - adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari; V adalah Variabel ^b adalah mayoritas dari kultur Arizona, negatif ^c adalah mayoritas dari kultur Arizona, positif			

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella*

Uji atau substrat	Hasil
Urease	Positif (warna ungu-merah)
Indole test dan Polyvalent flagellar (H) test	Positif (warna violet pada permukaan), Negatif (tidak ada penggumpalan)
Lysine decarboxylase dan KCN	Negatif (warna kuning), positif (pertumbuhan)
Phenol red lactose broth	Positif (warna kuning dengan/atau tanpa gas) ^{(a), (b)}

Tabel A.3 (lanjutan)

Uji atau substrat	Hasil
Phenol red sucrose broth	Positif (warna kuning dengan/atau tanpa gas) ^(b)
KCN broth, Voges-Proskauer test dan Methyl red test	Positif (pertumbuhan), positif (warna pink-merah), negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: a adalah uji malonate broth positif lebih lanjut untuk mengamati jika biakan tersebut <i>Salmonella arizonae</i> b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> , uji lebih lanjut untuk mengamati spesies tersebut <i>Salmonella</i> .	

Sebagai alternative system tabung biokimia secara konvensional, bisa menggunakan 5 sistem biokimia komersial (API 20E, Enterotube II, Enterobacteriaceae II, MICRO-ID, atau Vitek GNI) untuk pendugaan identifikasi generic *Salmonella*. Sistem komersial tersebut dipilih berdasarkan analisa yang dibutuhkan. Perangkat biokimia komersial ini tidak dapat digunakan sebagai pengganti uji serologi.

A.9.4 Penentuan kapang dan khamir

A.9.4.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ atau suhu kamar selama 5 hari.

A.9.4.2 Pembenihan dan pengenceran

- buffer pepton water (BPW);
larutkan 25,5 g BPW dalam 1 000 ml air suling, sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.
- potato dextrose agar atau pembenihan yang lainnya seperti malt extract agar atau plate count agar yang ditambah dengan antibiotik kloramfenikol (100 mg/liter).
Larutkan 39 g PDA dalam 1 000 ml air suling, sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit, pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril, atau bisa juga dengan menambahkan antibiotik kloramfenikol 100 mg/liter.

A.9.4.3 Peralatan

- cawan petri gelas (15 mm x 100 mm) atau plastik (15 mm x 90 mm), disterilkan;
- pipet 1 ml; 1 ml; 5 ml dan 10 ml berskala;
- botol pengenceran gelas bersilikat yang resisten, dengan sumbat karet atau tutup uliran dari plastik;
- penangas air dengan termostat untuk mengatur suhu agar $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- lemari pengering atau inkubator $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- autoklaf;
- alat penghitung koloni bakteri
- oven terkalibrasi.

A.9.4.4 Prosedur

- a) Persiapan contoh
timbang 50 g contoh uji ke dalam kantong plastik yang steril, masukkan dalam 450 ml larutan pengencer (buffer pepton water) dengan cara aseptik sehingga diperoleh pengenceran 1:10, kemudian kocok campuran hingga homogen;
 - b) Dengan menggunakan pipet steril berbeda, buatlah pengenceran tingkat 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dari contoh yang telah dipersiapkan sesuai kebutuhan. Cara melakukan pengenceran sepuluh kali ialah dengan mencampur 10 ml dari tingkat pengenceran yang sebelumnya dengan 90 ml zat pengencer, semua tingkat pengenceran dikocok 25 kali dengan panjang busur 30 cm selama 7 detik.
 - c) kocok tiap botol pengenceran untuk melarutkan bahan yang mengendap, lalu pipet 1 ml dari setiap pengenceran untuk dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang telah diberi label dan lakukan duplo;
 - d) tuangkan (12 -15) ml media PDA suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke masing-masing cawan petri dalam waktu 15 menit sejak pengenceran pertama dibuat, untuk setiap deretan pengenceran, tuangkan pula agar dengan zat pengencer sebagai inokulum ke dalam cawan petri untuk digunakan sebagai kontrol;
 - e) pembenihan dan medium agar dicampur merata dengan menggerakkan cawan petri ke belakang, ke depan dan memutar pada permukaan datar;
 - f) biarkan sampai campuran dalam cawan membeku;
 - g) masukkan cawan petri ke dalam lemari pengering dengan posisi tidak terbalik pada suhu $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 5 hari;
 - h) hitung jumlah koloni kapang/ khamir pada setiap cawan petri (perhitungan dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai hari ke lima), koloni kapang biasanya buram dan berbulu sedangkan koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam), tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang atau khamir.
- nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang/ khamir per gram contoh

A.9.4.5 Penyajian hasil

- a) hitung koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 10 sampai dengan 150 koloni dengan menggunakan alat penghitung koloni;
- b) hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran;
- c) nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang/ khamir per gram
- d) jika tidak terdapat koloni pada cawan petri, laporkan kapang/ khamir sebagai <10

A.9.4.6 Cara menghitung dan membulatkan angka

- a) bila angka ketiga dari kiri adalah 6 atau lebih besar, maka angka tersebut diganti menjadi nol dan angka kedua dibulatkan ke atas,
contohnya : 456 dilaporkan sebagai 460, penulisannya $4,6 \times 10^2$
- b) bila angka ketiga adalah 4 atau kurang dari 4, maka angka ketiga diganti dengan nol dan angka kedua dipertahankan,
contohnya : 454 menjadi 450, penulisannya $4,5 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5 maka dibulatkan sebagai berikut :
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil,
contohnya : 455 dilaporkan sebagai 460, penulisannya $4,6 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 445 dilaporkan sebagai 440, penulisannya $4,4 \times 10^2$

Bibliografi

AOAC 963.15:2000, *Fat in Cocoa Products*.

AOAC 931.04:2000, *Moisture in Cocoa Product*.

AOAC 972.15:2000, *Ash of Cocoa Products*.

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2001. *Yeast, Molds and Mycotoxins*. Chapter 18.

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.

Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2005. *Salmonella*. Chapter 5.









BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id